

**NEW PEPTIDE DERIVATIVE AND AGENT CONTAINING DERIVATIVE AS ACTIVE COMPONENT**

**Patent number:** JP11100399  
**Publication date:** 1999-04-13  
**Inventor:** KASHIMOTO KAZUHISA; NAGANO YUMIKO  
**Applicant:** ITOHAM FOODS INC  
**Classification:**  
- **international:** C07K14/575; A61K7/06; A61K38/00; C12N15/09  
- **european:**  
**Application number:** JP19970262539 19970926  
**Priority number(s):** JP19970262539 19970926

Report a data error here

**Abstract of JP11100399**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide the new peptide derivative having a specific amino acid sequence and excellent persistency of bronchial dilation action, exhibiting blood flow increasing action, hair-growing action and sexual behavior activating action and useful as bronchodilator, blood flow increasing agent, hair-growing agent, impotence treating agent, etc. **SOLUTION:** This new recombinant peptide is a peptide composed of amino acids of the formula (Xa2, Xa3, Xa4, Xa5, Xa6 and Xa7 are each Lys or Arg; Xa1 is Met, Leu or nLeu), having excellent persistency of bronchodilating action and exhibiting blood flow increasing action, hair-growing action or sexual behavior activating action or a peptide composed of the amino acids of the formula provided that one or several amino acids are depleted, substituted or added and having a physiological action similar to that of the peptide of the formula. The peptide is producible by synthesizing a peptide having persistent bronchodilating action, etc., from VIP (vasoactive intestinal peptide) and PACAP (pituitary adenylate cyclase activation peptide) by peptide synthesizing process.

H-His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Arg-Gln-Xa<sub>1</sub>-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Xa<sub>2</sub>-Xa<sub>3</sub>-Tyr-Xa<sub>4</sub>-Gln-Xa<sub>5</sub>-Val-Xa<sub>6</sub>-Asn-Xa<sub>7</sub>-OH

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

特開平11-100399

(43) 公開日 平成11年(1999) 4月13日

(51) Int.Cl.<sup>8</sup>

識別記号

F I

C 0 7 K 14/575

Z N A

C 0 7 K 14/575

Z N A

A 6 1 K 7/06

A D A

A 6 1 K 7/06

A D A

38/00

A B N

37/02

A B N

A C F

A C F

A C V

A C V

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平9-262539

(22) 出願日

平成9年(1997) 9月26日

(71) 出願人 000118497

伊藤ハム株式会社

兵庫県神戸市灘区備後町3丁目2番1号

(72) 発明者 榎本 和久

茨城県北相馬郡守谷町久保ヶ丘1丁目2番

伊藤ハム株式会社中央研究所内

(72) 発明者 長野 由美子

茨城県北相馬郡守谷町久保ヶ丘1丁目2番

伊藤ハム株式会社中央研究所内

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54) 【発明の名称】 新規ペプチド誘導体およびそれを有効成分とする薬剤

(57) 【要約】

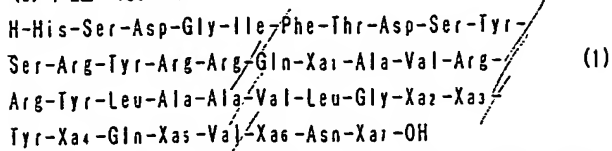
【解決手段】 平滑筋弛緩作用に基づく気管支拡張作用の持続性に優れた、新規ペプチド、その薬学的に許容される塩、これらを有効成分として含有する気管支拡張剤、血流改善剤、育毛剤、およびインポテンツ治療剤を提供する。

【効果】 本発明によれば、VIPやPACAPよりも持続性のある気管支拡張作用を有する、種々の剤形の気管支拡張剤、血流改善剤、育毛剤、およびインポテンツ治療剤を製造することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の (a) または (b) の組換えペプチド。

(a) 下記一般式 (1) :

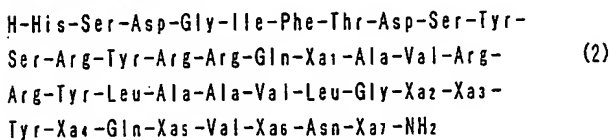


(式中、Xa2、Xa3、Xa4、Xa5、Xa6 および Xa7 は、同一でも異なってもよく、それぞれ Lys または Arg を示し；Xa1 は、Met、Leu および nLeu からなる群から選ばれるアミノ酸を示す。) で表されるアミノ酸からなり、かつ、気管支拡張作用の持続性に優れ血流増加作用、育毛作用または性行動活性化作用を有するペプチド。

(b) アミノ酸配列 (a) において、1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、気管支拡張作用の持続性に優れ血流増加作用、育毛作用または性行動活性化作用を有するペプチド。

【請求項 2】 以下の (a) または (b) の組換えペプチド。

(a) 下記一般式 (2) :

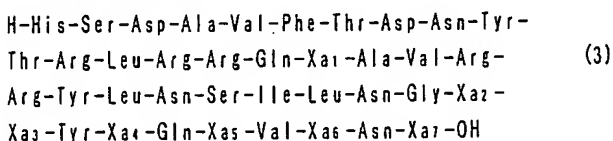


(式中、Xa2、Xa3、Xa4、Xa5、Xa6 および Xa7 は、同一でも異なってもよく、それぞれ Lys または Arg を示し；Xa1 は、Met、Leu および nLeu からなる群から選ばれるアミノ酸を示す。) で表されるアミノ酸からなり、かつ、気管支拡張作用の持続性に優れ血流増加作用、育毛作用または性行動活性化作用を有するペプチド。

(b) アミノ酸配列 (a) において、1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、気管支拡張作用の持続性に優れ血流増加作用、育毛作用または性行動活性化作用を有するペプチド (ただし、Xa2、Xa4、Xa6 および Xa7 が同時に Lys であり、かつ Xa3 および Xa5 が同時に Arg になることはない。また、28 位の Gly~Xa1 までのペプチドが同時に欠失することはない)。

【請求項 3】 以下の (a) または (b) の組換えペプチド。

(a) 下記一般式 (3) :



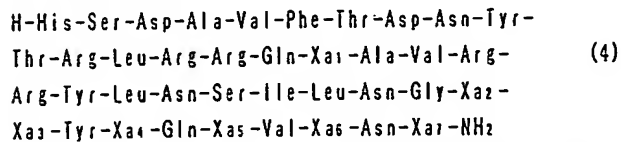
(式中、Xa2、Xa3、Xa4、Xa5、Xa6 および Xa7 は、同一でも異なってもよく、それぞれ Lys または Arg を示し；Xa1 は、Met、Leu および nLeu からなる群から選ばれるアミノ酸を示す。) で表されるペプチド。

(b) アミノ酸配列 (a) において、1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、もしくは付加されたアミノ酸配列から

なり、かつ、気管支拡張作用の持続性に優れ血流増加作用、育毛作用または性行動活性化作用を有するペプチド。

【請求項 4】 以下の (a) または (b) の組換えペプチド。

(a) 下記一般式 (4) :



(式中、Xa2、Xa3、Xa4、Xa5、Xa6 および Xa7 は、同一でも異なってもよく、それぞれ Lys または Arg を示し；Xa1 は、Met、Leu および nLeu からなる群から選ばれるアミノ酸を示す。) で表されるペプチド。

(b) アミノ酸配列 (a) において、1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、気管支拡張作用の持続性に優れ血流増加作用、育毛作用または性行動活性化作用を有するペプチド (29 位の Gly~Xa1 までのペプチドが同時に欠失することはない)。

【請求項 5】 請求項 1~4 のいずれかに記載のペプチドまたはそれらの薬学的に許容される塩。

【請求項 6】 請求項 1~4 のいずれかに記載のペプチドまたはそれらの薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、気管支拡張剤。

【請求項 7】 請求項 1~4 のいずれかに記載のペプチドまたはそれらの薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、血流改善剤。

【請求項 8】 請求項 1~4 のいずれかに記載のペプチドまたはそれらの薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、育毛剤。

【請求項 9】 請求項 1~4 のいずれかに記載のペプチドまたはそれらの薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、インポテンツ治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規ペプチド、その薬学的に許容される塩、これらを有効成分として含有する気管支拡張剤、血流改善剤、育毛剤およびインポテンツ治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 VIP (血管作動性腸管ペプチド (Vaso active Intestinal Peptide)) は、脳-腸管ペプチドと呼ばれる、血流促進、血圧低下作用をもつ生理活性ペプチドの一種である。この VIP は、1970 年にブタ腸管から抽出されており、28 個のアミノ酸残基からなる (S. I. Said, V. Mutt, Science, 169:1217 (1970))。また、PACAP (下垂体アデニレートサイクラーゼ活性化ペプチド (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide)) は、1989 年、羊の視床下部から下垂体培養細胞の

イ系を指標にして単離され、構造が決定された38個のアミノ酸残基よりなるペプチドである(A. Miyata, A. Arimura et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 164:567 (1989))。

【0003】このPACAPのN末端側から27残基がPACAPの活性を有しており、この27個のアミノ酸配列は、VIPと極めて類似した構造を有する。VIPおよびPACAPのアミノ酸配列はセクレチン、グルカゴン等に類似していることから、グルカゴンファミリーに属するペプチドとされている。また、VIPおよびPACAPは、呼吸器系においては気管支平滑筋への弛緩作用が非常に強く、アセチルコリン、ヒスタミン、セロトニン等の刺激物質によって惹起された平滑筋収縮を緩解する作用がある。かかる弛緩作用は、アドレナリン $\beta_2$ レセプターを介して作用する一般の気管支拡張による弛緩作用とは異なり、 $\beta_2$ レセプター刺激剤が有効に作用しない難治性の喘息発作に対しても効果が期待されている。

【0004】また、気管支拡張作用・降圧作用、育毛作用を有する27〜31個のアミノ酸残基からなるペプチドが知られている(特開昭62-246595号公報、特開昭64-83012号公報、特開平4-297498公報および特開平8-333276号公報参照。)。他にも、公知のVIPよりも強い血流増加作用を有し、VIPよりも血圧降下作用の少ない、作用の分離したVIP誘導体が知られている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、VIP、PACAP、その他の上述した公知のペプチドよりも優れた気管支拡張作用を有するペプチドの開発が望まれており、また、これらのペプチドを含む血流増加作用に優れた血流改善剤の開発が望まれている。本発明の課題は、優れた気管支拡張作用の持続性と、血流増加作用とを有し、さらに、育毛作用および性行動活性化作用を有するペプチド、およびこれらを有効成分とする気管支拡張剤、血流改善剤、育毛剤またはインポテンツ治療剤を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、本発明者らは、VIPやPACAPよりも持続性のある気管支拡張作用、血流増加作用、育毛作用および性行動活性化作用を有する新規ペプチドを合成することに成功し、本発明を完成したものである。

【0007】すなわち、本発明は、以下の(a)または(b)の組換えペプチドである。

(a) 下記一般式(1) :

H-His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Arg-Gln-Xa1-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Xa2-Xa3-Tyr-Xa4-Gln-Xa5-Val-Xa6-Asn-Xa7-OH (1)

【0008】(式中、Xa2、Xa3、Xa4、Xa5、Xa6およびXa7は、同一でも異なってもよく、それぞれLysまたはArgを示し；Xa1は、Met、LeuおよびnLeuからなる群から選ばれるアミノ酸を示す。)で表されるアミノ酸からなり、かつ、気管支拡張作用の持続性に優れ血流増加作用、育毛作用または性行動活性化作用を有するペプチド。

(b) アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、気管支拡張作用の持続性に優れ血流増加作用、育毛作用または性行動活性化作用を有するペプチド。

【0009】また、本発明は、以下の(a)または(b)の組換えペプチドである。

(a) 下記一般式(2) :

H-His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Arg-Gln-Xa1-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Xa2-Xa3-Tyr-Xa4-Gln-Xa5-Val-Xa6-Asn-Xa7-NH2 (2)

【0010】(式中、Xa2、Xa3、Xa4、Xa5、Xa6およびXa7は、同一でも異なってもよく、それぞれLysまたはArgを示し；Xa1は、Met、LeuおよびnLeuからなる群から選ばれるアミノ酸を示す。ただし、Xa2、Xa4、Xa6、およびXa7が同時にLysであり、かつXa3およびXa5が同時にArgになることはない。また、28位のGly〜Xa7までのペプチドが同時に欠失することはない。)で表されるアミノ酸からなり、かつ、気管支拡張作用の持続性に優れ血流増加作用、育毛作用または性行動活性化作用を有するペプチド。

(b) アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、気管支拡張作用の持続性に優れ血流増加作用、育毛作用または性行動活性化作用を有するペプチド。

【0011】本発明はまた、以下の(a)または(b)の組換えペプチドである。

(a) 下記一般式(3) :

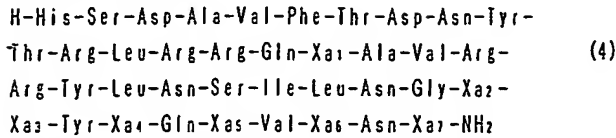
H-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-Xa1-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-Gly-Xa2-Xa3-Tyr-Xa4-Gln-Xa5-Val-Xa6-Asn-Xa7-OH (3)

【0012】(式中、Xa2、Xa3、Xa4、Xa5、Xa6およびXa7は、同一でも異なってもよく、それぞれLysまたはArgを示し；Xa1は、Met、LeuおよびnLeuからなる群から選ばれるアミノ酸を示す。)で表されるペプチド。

(b) アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、気管支拡張作用の持続性に優れ血流増加作用、育毛作用または性行動活性化作用を有するペプチド。

【0013】本発明はさらにまた、以下(a)または(b)の組換えペプチドである。

(a) 下記一般式(4)：



【0014】(式中、Xa2、Xa3、Xa4、Xa5、Xa6およびXa7は、同一でも異なってもよく、それぞれLysまたはArgを示し；Xa1は、Met、LeuおよびnLeuからなる群から選ばれるアミノ酸を示す。)で表されるペプチド。

(b) アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、気管支拡張作用の持続性に優れ血流増加作用、育毛作用または性行動活性化作用を有するペプチド(28位のGly~Xa7までのペプチドが同時に欠失することはない)。

【0015】上記のアミノ酸の付加、欠失または置換は、出願前周知の技術である部位特定変異誘発〔例えば、Nucleic Acids Research, Vol. 10, No. 20, p6487-6500を参照のこと。〕により実施することができ、アミノ酸の付加、欠失または置換に関し、1もしくは数個のアミノ酸とは、部位特定変異誘発により、付加、欠失または置換できる程度のアミノ酸をいう。このような、上記一般式(1)~(4)において付加、欠失または置換によ\*

His;ヒスチジン残基	Ser;セリン残基	Asp;アスパラギン酸残基
Ala;アラニン残基	Val;バリン残基	Phe;フェニルアラニン残基
Thr;スレオニン残基	Tyr;チロシン残基	Asn;アスパラギン残基
Leu;ロイシン残基	Arg;アルギニン残基	Lys;リジン残基
Gln;グルタミン残基	Met;メチオニン残基	Ile;イソロイシン残基
Gly;グリシン残基	nLeu;ノルロイシン残基	

【0020】

Boc;t-ブトキシカルボニル基	Aoc;t-アミルオキシカルボニル基
Bzl;ベンジル基	Z;ベンジルオキシカルボニル基
Tos;p-トルエンスルホニル基	OBul;t-ブチルエステル
OMe;メチルエステル	OBz;ベンジルエステル
ONP;p-ニトロフェニルエステル	Bom;ベンジルオキシメチル基
TFA;トリフルオロ酢酸	THF;テトラヒドロフラン
DCM;ジクロロメタン	DMF;ジメチルホルムアミド

【0021】

DCC; ジシクロヘキシルカルボジイミド  
WSC; N-エチル-N'-ジメチルアミノプロピル-カルボジイミド  
OSu; N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル  
HOSu; N-ヒドロキシコハク酸イミド  
HOBT; 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール  
DIEA; ジイソプロピルエチルアミン

【0022】本発明のペプチド誘導体は、具体的には、配列番号1のアミノ酸配列の1~27番までの27アミノ酸残基からなる配列に、さらに12残基までのアミノ酸が付

\*り変異を生じたペプチドを、以下、変異ペプチド(1)~(4)という。

【0016】さらに、本発明は、上記一般式(1)~(4)で表されるペプチドもしくは変異ペプチド(1)~(4)またはそれらの薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、気管支拡張剤を提供する。本発明はまた、上記一般式(1)~(4)で表されるペプチドもしくは変異ペプチド(1)~(4)またはそれらの薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、血流改善剤を提供する。

【0017】さらにまた本発明は、上記一般式(1)~(4)で表されるペプチドもしくは変異ペプチド(1)~(4)またはそれらの薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、育毛剤を提供する。加えて本発明は、上記一般式(1)~(4)で表されるペプチドもしくは変異ペプチド(1)~(4)またはそれらの薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、インポテンツ治療剤を提供する。

【0018】本明細書において、アミノ酸、ペプチド、保護基、溶媒その他に関して略号で表示する場合、国際純正および応用化学連合(IUPAC)、国際生化学連合(IUBU)の規定あるいは該当分野における慣用記号に従うものとする。ただしアミノ酸等に関し光学異性体がありうる場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。以下、その例を示す。

【0019】

40 加された構造を有する。本発明のペプチド誘導体においては、このペプチド誘導体が機能を発揮するためには、上記の27アミノ酸残基からなる配列は必須であるが、これに付加されるアミノ酸配列は配列番号3~6に示す12残基までの配列であればよく、具体的には、12アミノ酸残基からなる場合には、配列番号7または8に示すアミノ酸配列の28~39であればよい。この付加されるアミノ酸配列は、12アミノ酸残基までのアミノ酸配列からなることが好ましいが、すべてが揃っている必要はない。例えば、下記に示すアミノ酸配列のように、これらのうちの数個が欠失している群から選ばれる配列であってもよ

い。

Asn Gly Lys Lys Tyr Lys Gln Lys Val Lys Asn Lys (配列番号3)  
 Gly Arg Arg Tyr Arg Gln Arg Val Arg Asn Arg (配列番号4)  
 Asn Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg (配列番号5)  
 Gly Lys Arg Lys Arg Arg Lys (配列番号6)

【0024】本発明のペプチド誘導体は、公知のペプチド合成において常法として用いられる手段に従って合成できる。例えば「ザ、ペプチド(The Peptides)」第1巻(1966年) [SchrederとLuhke著、Academic Press, New York, U. S. A.]、あるいは「ペプチド合成」[泉屋ら著、丸善株式会社(1975年)]に記載されている方法に従って、アジド法、酸クロライド法、酸無水物法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法(p-ニトロフェニルエステル法、N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル法、シアノメチルエステル法等)、ウッドワード試薬Kを用いる方法、カルボイミダゾール法、酸化還元法、DCC-アディティブ(HONB、HOBt、HOSu)法その他の各種の方法により合成することができる。これらの方法は、固相合成法および液相合成法のいずれにおいても適用することができる。

【0025】本発明のペプチドは、上記のような一般的なポリペプチドの合成法により、例えば、目的とするペプチドのアミノ酸配列にしたがって、C末端アミノ酸に1個ずつ、順次アミノ酸を縮合させるいわゆるステップワイズ伸長法によって製造することもでき、また、目的とするペプチドを数個のフラグメントに分けて各フラグメントを合成し、それらをカップリングさせるフラグメント縮合法によって製造することもできる。

【0026】より詳細には、例えば、ステップワイズ伸長法による固相合成は、メリフィールド(Merrifield, R. B.)の方法 [Solid phase peptide synthesis, J. Amer. Chem. Soc., 85:2149-2159(1963)]に従って行うことができる。すなわち、まず、カルボキシル基と結合可能な官能基を有する不溶性樹脂に、目的とするペプチドのアミノ酸配列のC末端のアミノ酸をアミノ基を保護した状態で結合させる。次いで、該C末端アミノ酸のアミノ基の保護基を除去して得られた遊離のアミノ基に、目的とするペプチドのアミノ酸配列(本発明においては上記一般式(1)または一般式(2)のアミノ酸配列)に従って、カルボキシル基を活性化させたアミノ基を保護したアミノ酸を一つずつ順次ペプチド結合させ、アミノ基の保護基を除去する。この操作を繰り返して、1位のヒスチジン残基までアミノ酸残基を延長し、続いて得られたペプチドを前記樹脂から脱離させることにより製造することができる。

【0027】上記の方法においては、アミノ酸のペプチド結合に関与するアミノ基への保護基の結合および該保護基の脱離、並びにアミノ酸のペプチド結合に関与するカルボキシル基の活性化が必要である。また、必要に応じてアミノ酸の側鎖の官能基にも保護基を結合する。

【0023】

【0028】アミノ基を保護する場合に用いる保護基としては、通常用いられているものを挙げることができ、例えば、ベンジルオキシカルボニル(Z)、t-ブトキシカルボニル(Boc)、t-アミルオキシカルボニル(Aoc)、イソボルニルオキシカルボニル、p-メトキシベンジルオキシカルボニル、2-クロロベンジルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、o-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイルなどの基が挙げられる。

【0029】また、本発明の新規ペプチドの製造において、カルボキシル基を保護する場合に用いる保護基としては、通常用いられているものを挙げるができ、例えば、メチルエステル、エチルエステル、プロピルエステル、ブチルエステル、tert-ブチルエステル、シクロヘキシルエステル等のアルキルエステル、ベンジルエステル、p-ニトロベンジルエステル、メチルベンジルエステル、p-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド、tert-ブチルオキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジド等が挙げられる。シクロヘキシルエステルを使用することが、最終脱保護が容易であり、かつ副反応が少ないといった理由から好ましい。

【0030】ペプチド結合に関与するカルボキシル基の活性化も、上記のような従来公知の方法にて行うことができ、用いられる試薬等も公知のものから適宜選択し得る。例えば、カルボキシル基を活性化するために、該カルボキシル基と種々の試薬とを反応させて、例えば、対応する酸クロライド、酸無水物または混合酸無水物、アジド、活性エステル(例えば、ペンタクロロフェノール、p-ニトロフェノール、N-ヒドロキシコハク酸イミド、N-ヒドロキシベンズトリアゾール、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド等とのエステル)等を形成させればよい。

【0031】また、アミノ酸の中で、側鎖に官能基を有するものについては、ペプチド結合形成反応中はその官能基は保護されているのが好ましく、特に、His、Tyr、Thr、Lys、Asp、ArgおよびSerについては、その側鎖の官能基を保護しておくのが好ましい。官能基の保護は、通常用いられている方法で、下記のような保護基を結合させることにより行われる。本発明の新規ペプチドの合成終了後、これらの保護基は脱離される。

【0032】Hisのイミノ基の保護基としては、例えば、ベンジルオキシメチル(Bom)、トシル(Tos)、ベンジル(Bzl)、ベンジルオキシカルボニル(Z)、トリチル

等の基が挙げられる。SerおよびThrの基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができるが、必ずしも保護する必要はない。エステル化によって導入される保護基としては、例えば、アセチル等の低級アルカノイル基、ベンゾイル等のアロイル基、ベンゾイルオキシカルボニル、エチルオキシカルボニル等の炭酸から誘導される基等が好適に用いられる。またエーテル化によって導入される保護基としては、例えば、ベンジル(Bzl)、テトラヒドロピラニル、tert-ブチル等の基が好適に用いられる。

【0033】Tyrの水酸基の保護基としては、例えばベンジル(Bzl)、プロモベンジルオキシカルボニル(BzZ)、ジクロロベンジル(Cl<sub>2</sub>-Bzl)、ベンジルオキシカルボニル(Z)、アセチル、トシル(Tos)等の基が挙げられる。Lysのアミノ基の保護基としては、例えば、ベンジルオキシカルボニル(Z)、クロロベンジルオキシカルボニル(Cl-Z)、ジクロロベンジル(Cl<sub>2</sub>-Bzl)、t-ブトキシカルボニル(Boc)、トシル(Tos)等の基が挙げられる。

【0034】Argのグアニジノ基の保護基としては、例えば、トシル(Tos)、ニトロ、ベンジルオキシカルボニル(Z)、t-アミルオキシカルボニル(Aoc)基等の基が挙げられる。Aspのカルボキシル基の保護は、例えば、ベンジルアルコール、メタノール、エタノール、tert-ブタノール等によるエステル化により行われる。

【0035】なお、ペプチド結合の形成反応は、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、カルボジイミダゾール等のカルボジイミド試薬やピロリン酸テトラエチル、ベンゾトリアゾール-N-ヒドロキシトリスジメチルアミノホスホニウムヘキサフルオロリン化物塩(Bop試薬)等の縮合剤の存在下に実施し得る場合もある。

【0036】上記の固相合成において用いる不溶性樹脂は、カルボキシル基と結合可能な官能基を有する樹脂であればいずれのものも使用でき、例えば、ベンズヒドリルアミン樹脂(BHA樹脂)、クロルメチル樹脂、オキシメチル樹脂、アミノメチル樹脂、p-メチルベンズヒドリルアミン樹脂(MBHA樹脂)、4-アミノメチルフェノキシメチル樹脂、4-ヒドロキシメチルフェノキシメチル樹脂、4-オキシメチルフェニルアセタミドメチル樹脂(PAM樹脂)等が挙げられる。樹脂へのアミノ酸の結合および合成されたペプチドの樹脂からの脱離は、公知の方法で行うことができる。

【0037】上記の固相合成に用いる溶媒としては、ペプチド結合形成に使用し得ることが知られている各種のもの、例えば、無水または含水のジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ピリジン、クロロホルム、ジオキサン、ジクロロメタン(DCM)、テトラヒドロフラン(THF)、酢酸エチル、N-メチルピロリドン、ヘキサメチルリン酸トリアミド(HMPA)等を、単独で、あるいは2種以上の混合溶媒として用い

ることができる。

【0038】本発明のペプチドは、以下のようにして合成することができる。固相合成の場合を例にとって説明する。固相として、MBHA樹脂を固相合成用反応容器に入れ、窒素ガスまたはアルゴンガスなどの非酸化性雰囲気中で、ジクロロメタン(DCM)、トリフルオロ酢酸(TFA)含有DCMで処理した後に、再びDCMで処理し、次いでジイソプロピルエチルアミン(DIEA)含有ジメチルホルムアミド(DMF)およびDMFで処理する。

10 【0039】次に、目的のペプチドの38位のアミノ酸を、例えば、BocやCl<sub>2</sub>Bzlなどの保護基で保護した後に、アミノ酸活性化容器中で、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)と1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)とを加えて反応させ、固相と結合させる。この場合、ダブルカップリングを行ってもよい。

【0040】ついで、固相に結合させたアミノ酸に、目的のペプチドの37位のアミノ酸を上記と同様にして結合させ、これを順次繰り返して1位のアミノ酸を結合させる。以上のようにして、各アミノ酸の側鎖が保護され、MBHA樹脂と結合したペプチドが得られる。このペプチドを、例えば、アニソールと無水フッ化水素とで処理し、無水フッ化水素を留去した後に、残渣をエーテルなどの適当な溶媒で処理した後に、酸で抽出する。ついで、抽出液をイオン交換樹脂とともに攪拌した後に濾過して不溶性樹脂を除き、凍結乾燥し、粗精製ペプチドを得ることができる。

【0041】合成されたペプチドは、通常の方法に従い脱塩、精製することができる。この粗精製ペプチドを、DEAE-セファロースもしくはCM-セルロースなどのイオン交換カラムクロマトグラフィー、またはセファデックスLH-20もしくはセファデックスG-25等の分配クロマトグラフィーなどによって部分精製することができる。

【0042】このようにして得た部分精製ペプチドは、シリカゲル等を固相とした順相クロマトグラフィーまたはODS-シリカゲル等を固相とした逆相クロマトグラフィーなどを用いて、さらにHPLCにより精製することができる。

【0043】上述のようにして精製した本発明のペプチドは、各種の酸を用いて、所望により、薬学的に許容される塩、例えば、酢酸塩、塩酸塩、リン酸塩等にすることができる。本発明のペプチドおよびその塩は、気管支拡張作用、血流改善作用、育毛作用および性行動活性化作用を有するため、気管支拡張剤、血流改善剤、育毛剤およびインポテンツ治療剤などとして使用することができる。本発明のペプチドまたはその塩は、単独で投与してもよく、また、これらを薬学的に許容され得る種々の賦形剤その他の成分と混合して、液状、ゲル状、半固体、または固体状などの様々な剤形とし、気管支拡張剤、血流改善剤、育毛剤またはインポテンツ治療剤として投与してもよい。賦形剤その他の成分は、剤形によつ



11

て適宜選択して使用する。

【0044】気管支拡張剤とする場合には、点鼻剤、吸入剤、経口剤、注射剤または経皮吸収剤とすることができる。吸入剤、経口剤、経皮吸収剤は在宅療法が可能であることから好ましい。特に吸入剤は、局所投与であり、局所作用が期待できるといった理由から好ましい。吸入剤とする場合には、安定化剤、緩衝剤、矯味剤、懸濁化剤、乳化剤、芳香剤、保存剤、溶解補助剤、またはその他の適当な添加剤を添加することができる。吸入剤による治療効果を上げるためには、上気道への沈着を可能な限り減らし、肺胞や末梢気道に薬剤を到達させる必要があることから、粒径1~5 $\mu$ mの顆粒剤とすることが好ましい。

【0045】また、錠剤などの経口剤とする場合には、乳糖、乳糖とデンプンの混合物などの賦形剤、矯味・矯臭剤、色素その他の成分を添加することができる。また、本発明のペプチドまたはその塩を有効成分とする錠剤に種々のコーティングを施し、糖衣錠、フィルムコーティング錠、腸溶錠などとしてもよい。さらに、注射用水に溶かして注射剤とする非経口用錠剤としてもよい。経口用錠剤は、吸入剤を使用できない幼児や夜間喘鳴を有する喘息患者などに投与する上で好適である。

【0046】さらに、注射剤とする場合には、等張化剤、pH調整剤、安定化剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、緩衝剤、保存剤またはその他の適当な添加剤を加えることができる。等張化剤としては、例えば、ブドウ糖もしくは塩化ナトリウムなど、pH調整剤としては、リン酸塩、ホウ酸もしくはホウ砂などを挙げることができる。安定化剤としては、アルブミン、ゼラチン、ソルビトールもしくはマンニトール、保存剤としては、0.1% フェノール、0.25%クレゾール、もしくは0.5%クロロブタノールなどがある。その他の添加剤としては、無痛化剤として使用する局所麻酔剤を挙げることができる。このような局所麻酔剤としては、具体的には、ベンジルアルコール、クロロブタノール、ブドウ糖、イノシット、グルコン酸カルシウム、アミノ酸、塩酸リドカイン、塩酸ジブカイン、塩酸メピバカインなどを挙げることができる。本発明のペプチドもしくはその塩を注射剤とする場合には、静脈注射用製剤とすることが、有効成分の吸収と薬効発現の上から好適である。

【0047】経皮吸収剤とする場合には、クリームやジェルなどの軟膏、塗布剤、パップ剤などとしてすることができる。軟膏とする場合には、ワセリン、パラフィン、プラスチックベース、シリコン、植物油、豚脂もしくはろう類などの疎水性基剤、もしくはバニシングクリームなどの親水性基剤(o/w型)、親水ワセリン、精製ラノリン、吸水軟膏、加水ラノリン、親水プラスチックベース、コールドクリームなどの吸水性基剤(w/o型)を含む乳化性基剤、マクロゴール類(PEG)軟膏などの水溶性基剤などを基剤として使用することができる。

12

【0048】また、塗布剤としては、ナトリウム石鹸などのアルカリ石鹸、オレイン酸カルシウムなどの金属石鹸をはじめとする石鹸類、硫酸化ヒマシ油(ロート油)などの硫酸化油、ラウリル硫酸ナトリウムなどのアルコールの硫酸エステルをはじめとする硫酸化物を包含する陰イオン型界面活性剤、塩化ベンザルコニウムなどの陽性石鹸などの陽イオン型界面活性剤、TEGO-51などの両性型界面活性剤、ポリオキシエチレングリコールアルキルエーテル、ソルビタンモノ脂肪酸エステル(Span類)、ポリソルベート80(Tween類)などの非イオン型界面活性剤、またはアラビアゴム、トラガントゴム、アルギン酸ナトリウムなどの植物成分を挙げることができる。また、保存剤としては、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチルなどを挙げることができる。

【0049】塗布剤とするときには、水、エタノール、エーテル、グリセリン、または植物油などを添加することができる。また、種々の布、フィルムなどに上記のような本発明のペプチドまたはその塩を含む軟膏またはクリームを適宜塗布してパップ剤として使用してもよい。

【0050】血流改善剤とする場合にも、上記の気管支拡張剤の場合と同様にして製剤化することができ、錠剤をはじめとする経口剤、または注射剤その他の非経口剤とすることができる。床ずれ(褥創)の場合は、経皮吸収によって局所的な作用が可能であり、副作用が少ないことなどの点で好適である。しかし、速やかに薬効を発揮させる上で注射剤とすることが好ましく、静脈注射用の製剤とすることがより好ましい。

【0051】注射剤とする場合には、液剤、凍結乾燥製剤、注射用錠剤など、いかなる剤形とすることもできる。いずれの剤形であっても、使用する際には、血液と等張な滅菌製剤とすることが好ましい。液剤とする場合には、例えば、本発明のペプチドを生理食塩水に溶解させ、このペプチドの投与量が、体重60kgのヒトに対して1nmol/回となるように、所望により、上述のような保存剤その他の成分を適宜加えてもよい。また、凍結乾燥製剤とする場合には、生理食塩水などに溶解した本発明のペプチドまたはその塩に、ヒト血清アルブミンなどの安定化剤、pH調節剤などを添加し、その後に凍結乾燥してもよい。

【0052】育毛剤とする場合には、上記のペプチドを適当な溶媒に溶解または懸濁させて、液剤、懸濁剤、乳剤、エアゾール剤またはローション剤などの液体状の製剤としてもよく、または軟膏、ゲル、ペーストまたはクリームなどの半固形状の製剤としてもよい。

【0053】上記のような製剤とする場合には、一般に揮散し得る希釈剤または溶剤を使用することが、局所的な適用が可能で、適用部位に実質的に活性成分を残存させることが可能となるために好ましい。このような希釈剤または溶剤としては、エタノール、イソプロパノール



などのC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>のアルコールなどを挙げることができる。この他に、ろう類、乳化剤、pH調整剤、芳香剤、乳化剤、保存剤、溶解補助剤、着色剤またはその他の適当な添加剤を使用することができる。ろう類としては、ミツロウ、木ロウ、各種の合成ワックスなどを例示することができ、乳化剤としては、各種の高級アルコール、多価アルコール、脂肪酸、各種の脂質などを例示することができる。また、保存剤としてはアジ化ナトリウムを、着色剤としては、各種の色素などを挙げることができる。

【0054】このような液体製剤とする場合には、本発明のペプチドを、例えば、約0.001~約5.0w/v%、より好ましくは、約0.01~3.0w/v%の範囲で添加する。添加するペプチドの量は、製剤基剤の組成などに応じて適宜調節することができる。

【0055】半固形製剤とする場合には、各種のワックスおよびろう類、高級アルコール、多価アルコール、無機顔料などを配合することができる。ワックスおよびろう類としては、ミツロウ、合成ワックスなどを挙げることができる。また、多価アルコールとしては、ワセリン、ラノリン、グリセリンなどを挙げることができ、無機顔料としては、無水ケイ酸、ベントナイトなどを挙げることができる。また、ビタミン、アセチルコリン誘導体などの末梢神経拡張剤、サリチル酸などの角質溶解剤、ヒアルロン酸などの保湿剤、芳香剤などを添加してもよい。

【0056】半固形製剤とすると、適用部位全体に均一に分散させることが可能であり、かつ、必要以上に適用部位の範囲を超えて広がったり、流れたりすることがないという利点がある。このような半固形製剤とする場合には、本発明のペプチドを、例えば、約0.001~約5.0w/v%、より好ましくは、約0.01~3.0w/v%の範囲で添加する。添加するペプチドの量は、製剤基剤の組成などに応じて適宜調節することができる。

【0057】インポテンツ治療剤とする場合には、経皮吸収剤とすることができる。経皮吸収剤とする場合には、クリームやジェルなどの軟膏などとしてすることができる。軟膏とする場合には、血流改善剤として上述したと同様に、各種の疎水性基剤、親水性基剤(o/w型)、吸水性基剤(w/o型)を含む乳化性基剤、および水溶性基剤などを基剤として使用することができる。

【0058】乳化剤もまた、同様に、陰イオン型界面活性剤、陽イオン型界面活性剤、両性型界面活性剤、非イオン型界面活性剤、および各種植物成分を挙げることができる。また、保存剤としては、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチルなどを挙げることができる。

【0059】本発明のペプチドまたはその塩の投与方法としては、例えば、上述のようして製造した経口剤によ

る全身投与、または非経口剤による局所投与がある。具体的な局所投与方法としては、吸入エアゾール剤などによる吸入、注射による投与、塗布による経皮吸収等を挙げることができる。

【0060】本発明のペプチドを上記のような製剤として投与する場合の投与量は、用途、患者の症状、年齢、体重等や、投与方法などにより適宜決定することができる。気管支拡張剤として投与する場合は、通常1人1日当たり約1ng~約1mg/kg体重の範囲で使用するのが好ましく、約100ng~約100μg/kgとすることが好ましい。血流改善剤として使用する場合には、気管支拡張剤として投与する場合と同様、約1ng~約1mg/kg体重の範囲で使用するのが好ましく、約100ng~約100μg/kgとすることが好ましい。

【0061】以下に製剤例を示す。

(製剤例)

(1) 気管支拡張剤

①吸入剤

本発明のペプチド	1.5 μg
乳 糖	2 mg

を混合してカプセルまたはディスク内に封入する。吸入量は1日1~2回(1錠/回)とする。

【0062】②注射剤

本発明のペプチド	175 μg
D-マンニトール	100 mg
塩化ナトリウム	900 mg

を100mlの注射用蒸留水に溶解し、注射用アンプルに1mlずつ分注する。

【0063】③錠剤

本発明のペプチド	0.05 mg
乳糖	50 mg

を混合し、打錠する。

【0064】(2) 血流改善剤

①吸入剤

本発明のペプチド	3 μg
乳 糖	2 mg

を混合してカプセルまたはディスク内に封入する。吸入量は1日1~2回(1錠/回)とする。

【0065】②注射剤

本発明のペプチド	175 μg
D-マンニトール	100 mg
塩化ナトリウム	900 mg

を100mlの注射用蒸留水に溶解し、注射用アンプルに1mlずつ分注する。

【0066】③錠剤

本発明のペプチド	0.05 μg
乳糖	50mg

を打錠して錠剤とする。

【0067】(3) 育毛剤

①乳剤性ローション

15  
 本発明のペプチド 10 g  
 サラシツロウ 100 mg  
 セチルアルコール 1.5 g  
 ラウリル硫酸ナトリウム 0.5 g  
 グリセリン 5.0 mL  
 精製水 100.0 mL  
 を混合して0.1%のローションタイプの育毛剤を得る。

#### 【0068】②クリーム

本発明のペプチド 50 mg  
 白色ワセリン 1 g  
 DMSO 7 滴  
 精製水 3 g  
 をホモジネートして混合し、0.25%のクリームの育毛剤を得る。

#### 【0069】(4)インポテンツ治療剤

本発明のペプチド 50 mg  
 ラノリン 1 g  
 DMSO 7 滴  
 精製水 3 g  
 をホモジネートして混合し、0.25%のクリームのインポテンツ治療剤を得る。

#### 【0070】

【実施例】以下、本発明を実施例を挙げてより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0071】以下の実施例において、得られた純粋ペプチドの同定は、下記に示す高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の保持時間の測定、旋光度の測定およびアミノ酸分析により行った。

・高速液体クロマトグラフィー(HPLC)  
 高速液体クロマトグラフィー分析には、LC-Module-1(日本ウォーターズ・リミテッド社製)を用いた。

#### 【0072】(HPLC分析条件)

カラム: TSK GEL ODS-120T (4.6×250mm)  
 溶離液: 0.1% TFA-アセトニトリル  
 (アセトニトリルを20%から50%に毎分1%ずつ変化させる直線勾配グラジエント)

流速: 1 mL/min

検出波長: 220 nm

#### 【0073】・旋光度

旋光度の測定には、DIC-370(日本分光工業社製)を用いた。

#### (旋光度測定条件)

光線: Naランプ 589 nm

温度: 20℃

層長: 100 mm

濃度: 1% (0.1M-酢酸中)

#### 【0074】・アミノ酸分析

アミノ酸分析は、得られたペプチドを6N-HCl (0.1%フェノール含有) 中で110℃、20時間加水分解した後に、

16

日立アミノ酸分析装置500型(日立製作所社製)を用いて行った。

#### 【0075】[実施例1] ペプチド1の製造

下記式

H-His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys-Arg-Tyr-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Asn-Lys-NH<sub>2</sub>

で表されるペプチド1(配列番号8)を製造した。固相合成装置として Milligen Bioreserch社製ペプチドシンセサイザー-9600を用いて固相合成を行った。

【0076】まず、MBHA樹脂(ペプチド研究所社製、アミノ基0.12mmol/g) 120mgをペプチド固相合成用反応容器に入れ、DCM 8 mL (4回、各1分)、60% TFA含有DCM溶液 8 mL (20分)、DCM 4 mL (3回、各15秒)、DIEA 1 mL含有DMF溶液 3 mL (2回、各1分)、DMF 8 mL (6回、各40秒)の順に、アルゴンガス気流中撹拌下で処理した。尚、各処理毎に濾過を行った。

【0077】一方、上記アミノ酸配列の38位のアミノ酸残基に相当するBoc-Lys (Cl<sub>2</sub>Bzl)-OH 2 mmolをDCM 4 mLに溶解し、アミノ酸活性化容器中でDCC (0.5M-DCM溶液) 3 mLおよびHOBt (0.5M-DCM溶液) 4 mLを加え、30分間反応させた。その後、反応混合液を濾過して濃縮容器に移し、これにDMF 3 mLを加え、アルゴンガス気流下にDCMを留去した。これにDMF 3 mLを加え、前記のペプチド固相合成用反応容器に移して30分間反応させた。ついでDCM 8 mLで洗浄した(6回、各20秒)。さらにBoc-Lys (Cl<sub>2</sub>Bzl)-OH 2 mmolをDCM 4 mLに溶解し、アミノ酸活性化反応容器中で同様の操作を繰り返した後(いわゆるダブルカップリング法)、濾過してBoc-Lys (Cl<sub>2</sub>Bzl)-MBHA樹脂を得た。

【0078】次に、得られたBoc-Lys (Cl<sub>2</sub>Bzl)-MBHA樹脂をDCM 8 mL (4回、各1分)で洗浄し、濾過した。これに、60% TFA含有DCM溶液 8 mL (20分)、DCM 4 mL (3回、各15秒)、DIEA 1 mL含有DMF溶液 3 mL (2回、各1分)、DMF 8 mL (6回、各40秒)の順にアルゴンガス気流中撹拌下で処理し、また、各処理毎に濾過を行った。

【0079】さらに、上記アミノ酸配列の37位のアミノ酸残基に相当するBoc-Asn-OH 2 mmolをDCM 4 mLに溶解し、アミノ酸活性化容器中でDCC (0.5M-DCM溶液) 1.5 mLを加え、7分間反応させた。その後、反応混合液を濾過して濃縮容器に移し、これにDMF 3 mLを加え、アルゴンガス気流下にDCMを留去した。これにDMF 3 mLを加え、前記のペプチド固相合成用反応容器に移して30分間反応させた。ついでDCM 8 mL (6回、各20秒)洗浄し、濾過してBoc-Asn-Lys (Cl<sub>2</sub>Bzl)-MBHA樹脂を得た。

【0080】以下、次に示す表に記載したアミノ基が保護されたアミノ酸(アミノ基保護アミノ酸)を用いて順次36位から1位までのアミノ酸をカップリングした。

#### 【0081】

【表1】

アミノ酸順序	アミノ基保護アミノ酸	使用量(mmol)
36	Boc-Lys(Cbz)-OH	2×2
35	Boc-Val-OH	2
34	Boc-Arg(Tos)-OH	2×2
33	Boc-Gln-OH	2×2
32	Boc-Lys(Cbz)-OH	2×2
31	Boc-Tyr(Bzl)-OH	2
30	Boc-Arg(Tos)-OH	2×2
29	Boc-Lys(Cbz)-OH	2×2
28	Boc-Gly-OH	2
27	Boc-Leu-OH	2
26	Boc-Val-OH	2
25	Boc-Ala-OH	2
24	Boc-Ala-OH	2×2
23	Boc-Leu-OH	2
22	Boc-Tyr(Bzl)-OH	2
21	Boc-Arg(Tos)-OH	2×2
20	Boc-Arg(Tos)-OH	2×2
19	Boc-Val-OH	2
18	Boc-Ala-OH	2
17	Boc-Leu-OH	2
16	Boc-Gln-OH	2×2
15	Boc-Arg(Tos)-OH	2×2
14	Boc-Arg(Tos)-OH	2×2
13	Boc-Tyr(Bzl)-OH	2
12	Boc-Arg(Tos)-OH	2×2
11	Boc-Ser(Bzl)-OH	2
10	Boc-Tyr(Bzl)-OH	2
9	Boc-Ser(Bzl)-OH	2
8	Boc-Asp(OBzl)-OH	2
7	Boc-Thr(Bzl)-OH	2
6	Boc-Phe-OH	2
5	Boc-Ile-OH	2
4	Boc-Gly-OH	2
3	Boc-Asp(OBzl)-OH	2
2	Boc-Ser(Bzl)-OH	2
1	Boc-His(Bom)-OH	2×2

【0082】上記固相合成において、Asn、Arg、Gln、Hisを用いた場合はダブルカップリングを行った(表中、ダブルカップリングを行った部分は、2×2で示す)。

【0083】このようにして、下記式：

Boc-His(Bom)-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Gly-Ile-Phe-Thr(Bzl)-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Tyr(Bzl)-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Gln-Leu-Ala-Val-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Tyr(Bzl)-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys(Cbz)-Arg(Tos)-Tyr(Bzl)-Lys(Cbz)-Gln-Arg(Tos)-Val-Lys(Cbz)-Asn-Lys(Cbz)-MBHA樹脂で表される保護ペプチド-MBHA樹脂4.03gを得た。

【0084】上記の保護ペプチド-MBHA樹脂3.54gにアニソール5mLを加え、さらに無水フッ化水素25mLを加えて、0℃で1時間撹拌した。反応後、無水フッ化水素を減圧下留去後、残渣をエーテルで洗浄し、これに0.1M酢酸100mLを加えてペプチドを抽出した。

【0085】抽出液をアンバーライトIR-410の陰イオン交換樹脂20mLとともに15分間撹拌した後、不溶性樹脂を濾過により除去した。得られた溶液は、0.22μミリポアフィルターにて濾過した後、凍結乾燥して850mgの白色粉末を得た。次にCM-セルロースカラム(2.5×30cm)にかけ、0.05Mから0.5Mの直線勾配をもったAcONH<sub>4</sub>(pH7.0)で溶出(10mL/フラクション)を行い、フラクション65~80を集めて目的とするペプチドの部分精製物350mgを得た。これをさらに、以下に示す条件にて分取用高速液体クロマトグラフィーで精製した。

【0086】

カラム：TSK GEL ODS-120T (21.5×300mm)

溶媒：0.1%TFA-アセトニトリル(アセトニトリルを20%から40%に変化させる直線勾配グラジエント)

流速：10mL/min

目的物質であるピーク相当の溶出液を凍結乾燥し、当該高速液体クロマトグラフィーにより、上記のペプチドの部分精製物100mgに対して精製ペプチド55mgを得た。この精製ペプチドについて、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の保持時間の測定、旋光度の測定およびアミノ酸分析を行った。その結果を下記に示す。

【0087】・HPLCの保持時間：25.1分

・[α]<sub>D</sub>：-54.3°

10・アミノ酸分析

Asp(3) 3.01, Thr(1) 0.95, Ser(3) 2.67, Glu(2) 2.07, Gly(2) 2.00, Ala(3) 3.15, Val(3) 2.97, Ile(1) 0.91, Leu(3) 3.09, Tyr(4) 4.01, Phe(1) 1.03, His(1) 1.25, Arg(7) 7.19, Lys(4) 4.05

【0088】【実施例2】ペプチド2の製造

実施例1と同様の方法で、下記式：

H-His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Arg-Arg-Tyr-Arg-Gln-Arg-Val-Arg-Asn-Arg-NH<sub>2</sub>

で表される精製ペプチド2(配列番号9)を得た。この精製ペプチドの収量を下記に示す。また、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の保持時間の測定、旋光度の測定およびアミノ酸分析を行った。その結果を下記に示す。

【0089】・収量85mg

・HPLCの保持時間：22.3分

・[α]<sub>D</sub>：-54.9°

・アミノ酸分析

30 Asp(3) 2.91, Thr(1) 0.81, Ser(3) 2.45, Glu(2) 1.98, Gly(2) 2.09, Ala(3) 3.26, Val(3) 2.42, Ile(1) 0.73, Leu(3) 3.00, Tyr(4) 4.12, Phe(1) 0.81, His(1) 1.00, Arg(11) 11.5

【0090】【実施例3】ペプチド3の製造

実施例1と同様の方法で、下記式：

H-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-Gly-Lys-Arg-Tyr-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Asn-Lys-NH<sub>2</sub>

40 で表される精製ペプチド3(配列番号10)を得た。この精製ペプチドの収量を下記に示す。また、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の保持時間の測定、旋光度の測定およびアミノ酸分析を行った。その結果を下記に示す。

【0091】・収量96mg

・HPLCの保持時間：22.9分

・[α]<sub>D</sub>：-54.9°

・アミノ酸分析

50 Asp(6) 5.62, Thr(2) 1.76, Ser(2) 1.63, Glu(2) 2.00, Gly(1) 0.98, Ala(2) 1.93, Val(3) 2.70, Ile(1)

19

0.93, Leu(4) 3.90, Tyr(3) 2.8, Phe(1) 0.98, His(1)  
0.94, Arg(7) 6.57, Lys(4) 4.04

#### 【0092】〔実施例4〕ペプチド4の製造

実施例1と同様の方法で、下記式：

H-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-  
Leu-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Asn-Ser-  
Ile-Leu-Asn-Gly-Arg-Arg-Tyr-Arg-Gln-Arg-Val-Arg-  
Asn-Arg-NH<sub>2</sub>

で表される精製ペプチド4（配列番号11）を得た。この精製ペプチドの収量を下記に示す。また、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）の保持時間の測定、旋光度の測定およびアミノ酸分析を行った。その結果を下記に示す。

【0093】・収量86mg

・HPLCの保持時間：20.3分

・ $[\alpha]_D$ ：-53.4°

・アミノ酸分析

Asp(6) 5.64, Thr(2) 1.83, Ser(2) 1.79, Glu(2) 2.07, Gly(1) 1.09, Ala(2) 2.04, Val(3) 2.84, Ile(1) 0.95, Leu(4) 4.00, Tyr(3) 2.88, Phe(1) 1.02, His(1) 0.98, Arg(11) 11.44

【0094】〔実施例5〕上記実施例1～4で得られた精製ペプチド1～4について下記の方法で気管支拡張作用の効果を評価し、VIPおよびPACAPと比較した。体重450～500gの雌のモルモットの頸静脈を切断し、開胸し、直ちに気管を取り出した。これを直ちにクレブス液に入れ、輪状に切断し、軟骨部分同士をスチール性の糸でつなぎ、鎖状にした。次いで平滑筋部分がつながるように平滑筋部分と反対側の軟骨部分を切断した。

【0095】できあがった標本を内容量約10mLの恒温オルガンバスに入れ上下につるした。下部を固定し、上部を1.4gの負荷をかけたグラスフォーストランスデューサー（Grass force transducers）に接続し、弛緩作用を測定した。この標本には94%酸素と6%炭酸ガスとを十分に吹き込み、かつ0.1μmol/Lカルバコールを含有する37℃のクレブス液を、0.33mL/minの流速で上部より滴下した。この滴下液に加えた試料の容量に応じて弛緩反応が起こることから、これを利用してVIPおよびPACAPと本発明のペプチドにおける気管支平滑筋に対する弛緩作用を比較した。

【0096】VIP、PACAPおよび本発明のペプチドの試料溶液は、オルガンバス内の濃度を調製するため、最終濃度の100倍の濃度で作製し、カルバコール滴下から30分後に100μLを滴下した。カルバコール無添加の時の平滑筋の収縮の度合いを0%、カルバコール添加の時の平滑筋の収縮の度合いを100%とし、試料を添加した時の最も低い収縮の度合い（最大の弛緩値）Aを求め、下記式から最大弛緩率Bを計算した。

【0097】最大弛緩率B（%）=100-A

また、最大弛緩後、試料添加から最大弛緩値の半分の値

20

を示すまでの時間（1/2半減時間Tという）を求めた。図1にはPACAP、図2には実施例1で得られたペプチド1、図3にはVIP、図4には実施例3で得られたペプチド3の、それぞれ添加量0.3μM、1μMおよび3μMの3用量についての気管支平滑筋の弛緩率の経時変化を示す。また、表1には、各ペプチドの各用量における最大弛緩率Bと半減期Tを示す。

【0098】

【表2】

ペプチド	0.3μM		1μM		3μM	
	B (%)	T (分)	B (%)	T (分)	B (%)	T (分)
PACAP	40	60	90	80	90	100
VIP	45	130	80	150	85	240
ペプチド1	85	>360	90	>360	95	>360
ペプチド2	90	>360	95	>360	98	>360
ペプチド3	95	>360	98	>360	98	>360
ペプチド4	98	>360	98	>360	98	>360

【0099】図1～4および表2から、3μMにおけるペプチド1およびペプチド3の最大弛緩率Bは、それぞれ95%および98%であり、半減時間Tはともに360分以上となることからわかる。したがって、本発明のペプチドは、VIPやPACAPと同等の弛緩効果を有しながら、VIP、PACAPよりも作用時間が長い、即ち持続性に優れるものであることが確認された。

【0100】〔実施例6〕血流増加作用の評価

さらに、実施例1～4で得られた精製ペプチド1～4について、下記の方法で血流増加作用の効果を評価し、VIPおよびPACAPと比較した。体重220～250gのWistar系雄性ラット18匹を1群3匹としてペントバルビタールの腹腔内投与（25mg/kg）により麻酔し、背位に固定した。血圧は頸動脈に動脈カニューレを挿入し、ヘパリン加生理食塩水（10U/mL）を満たしたドームキット（SCK-512、日本光電）を介して血圧トランスデューサー（DX-300、日本光電）に接続し、ひずみ血圧用アンプ（AP-6016、日本光電）により測定した。

【0101】血流量は、右腿動脈に血流測定用プローブ（FR-030T、日本光電）を取り付け、電磁血流量（MFV-3200、日本光電）に接続して測定した。動脈内への薬物投与は100pmol/kgとした。薬物の投与による血流量および血圧の変化は、記録紙上に描かれた曲線と座標軸とで囲まれた面積が、薬物投与の前後でどれだけ変化したかを、薬物投与前のこの面積に対する比として表した。表3に、本発明のペプチドを投与したラットの血流量の増加および血圧の変化を示す。

【0102】

【表3】

投与したペプチド	血流量 (mL/min)	増加率 (%)	血圧 (mmHg)
PACAP	16.04±5.92	100.0	-5.83±3.42
VIP	10.18±3.36	63.5	-4.95±3.85
ペプチド1	60.86±39.25	379.4	-0.64±0.14
ペプチド2	62.03±53.29	386.7	-0.88±0.59
ペプチド3	62.85±50.09	392.5	-2.88±1.56
ペプチド4	64.43±69.67	401.6	-2.75±1.86

21

【0103】表3に示すように、ペプチド1～4をそれぞれ100pmol/kg投与したときのラットの血圧変化はほとんど認められなかった。

#### 【実施例7】 急性毒性試験

実施例1～4で得られたペプチド1～4を生理食塩水に溶解し、体重20～30gのICR径マウス（5週齢、雄8匹／雌7匹）を各群15匹として、10mg/kgの用量で静脈内投与を行った。投与後72時間のデータを表4に示す。

【0104】

【表4】

ペプチド番号	死亡例／投与例	生存率 (%)
1	10/15	100
2	0/15	100
3	0/15	100
4	0/15	100

【0105】表4に示すように、死亡例は認められなかった。

#### 【実施例8】 マウス育毛効果

##### (1) ローションの調製

表5に示す乳剤性ローション基剤に100mgの本発明のペプチド1～4を加え、0.1%のローションタイプの育毛剤を得た。

【0106】

【表5】

乳剤性ローション基剤配合	
サラシミンロウ	0.1 g
セチルアルコール	1.5 g
ラウリル硫酸ナトリウム	0.5 g
グリセリン	5.0 ml
精製水	100.0 ml

【0107】以上を混合して、0.1%ローションを得た。また、対照用に、上記の組成の中から本発明のペプチドのみを除いた対照（コントロール）を調製した。また、効果の比較のために、本発明のペプチドに代えてPACAP、またはVIPを同量含有するローションを調製した。

##### 【0108】 (2) マウスの育毛効果

マウスの皮膚に、上記(1)で調製した各ローションを塗着し、育毛実験を実施した。20週齢のC3H系雄性マウスを1群5匹として、7群に分けた。これらのマウスの背部の毛を刈り取りった。その部位に翌日より1日4回、3週間連続で各ローションを1回50μlずつ塗布した。

【0109】最終投与の翌日、投与部位の一定面積（1.5cm×2.5cm）を剃毛し、採取した毛の重量（mg）を測定し、各ローションによる育毛作用を比較検討した。剃毛はマウスをエーテルで麻酔させた後、シェービングクリームを塗布し、安全カミソリで行なった。採取した毛はビーカー内で水洗し、濾取し、65℃で24時間乾燥し、更に温室内に24時間放置した。この後に重量（mg）を測定し、発毛量とした。その結果を表6に示す。

【0110】

【表6】

22

各ペプチドの育毛効果

ローションの種類	平均重量 (平均±SD (mg))	育毛係数 (%)
コントロール	4.2±0.45	100
PACAP	8.7±0.52	207.1
VIP	9.3±0.39	221.4
ペプチド1	11.2±0.45	266.7
ペプチド2	11.4±0.45	271.4
ペプチド3	11.5±0.58	275.8
ペプチド4	11.8±0.51	281.0

【0111】表に示す通り、5匹のマウスの発毛重量の平均値はコントロール群で4.2mgであるのに対し、VIP配合ローションは9.3mg、PACAP配合ローションは8.7mgと育毛効果を示した。これに対し、本発明のペプチド1～4を配合したローションはいずれも11mg以上という高い値を示し、VIPよりも2割以上高い数字が得られた。このことから、本発明のペプチド1～4が強い育毛効果を有することが示された。また、Studentのt検定で検定した結果でも、有意に発毛を促進させている事が証明された（P<0.01）。

【0112】【実施例9】 雄性ラットの性行動に与える効果

##### (1) クリーム剤の調製

実施例1～4で得られた精製ペプチド各10mg、ラノリン1g、水3g、DMSO7滴を加えてホモジネートし、クリームを調製した。また、対照（コントロール）として、本発明のペプチドを含まないクリーム剤を調製した。比較のために、10mgのPACAPまたは10mgのVIPを含むクリーム剤を調製した。

【0113】(2) 雄性ラットの性行動に与える効果  
約3月齢のWistar系性実験雄性ラット35匹を1群5匹として7群に分けた。各ラットの体重は、約250g前後であった。これらのラットの精巣を除去して去勢し、少なくとも14日間、テストステロンを4μg/100g体重で連日投与した。上記の各ペプチドを30～50μg含む一定量の上記(1)で調製したクリーム剤を、ラットの性器官に局所投与した。

【0114】ラットの飼育は、上記雄性ラットおよび後述する交尾実験に用いた雌性ラットはいずれも、12時間明室（点灯）、12時間暗室（消灯）のサイクル中で行った。交尾試験の前に、それぞれの雄性ラットを少なくとも1時間、分離されたケージ中に置き、その後、性的に受容可能な雌性ラットをそれぞれの雄性ラットと一緒にした。試験時間は15分とし、15分以内に雄性ラットが交尾のための背乗りを行わない場合には、試験終了とした。評価は、15分の試験時間当たりの挿入回数、挿入までの潜伏時間、射精の有無を観察した。結果を表7に示す。

【0115】

【表7】

23

各ペプチドの性質

投与群	平均挿入回数 (回)	挿入までの平均 潜伏時間 (秒)	射精の有無
コントロール	9.0	40±1	1/4
PACAP	10.3	32±3	2/4
VIP	11.0	30±4	3/4
ペプチド1	12.5	24±3	4/4
ペプチド2	13.0	21±3	4/4
ペプチド3	14.0	22±5	4/4
ペプチド4	14.3	20±5	4/4

【0116】表7に示すように、PACAPおよびVIPを局所投与した場合には、潜伏時間が約2割短縮された。本発明のペプチドを局所投与した場合には、潜伏時間はさらに短縮され、コントロールの約半分となった。以上より、本発明のペプチドのインポテンツ治療効果が示された。

【0117】

【発明の効果】本発明によれば、平滑筋弛緩作用に基づく気管支拡張作用の持続性に優れたペプチドが提供される。このペプチドおよびその塩は気管支拡張作用を有するため、気管支拡張剤として有用である。さらに、本発明のペプチドおよびその塩は、公知のVIPよりも優れた血流増加作用を有するため、これらを有効成分とする血\*

配列

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Arg Gln  
 1 5 10 15  
 Xaa Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Xaa Xaa Tyr Xaa  
 20 25 30  
 Gln Xaa Val Xaa Asn Xaa  
 35 38

【0119】配列番号：2

配列の長さ：39

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

配列

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln  
 1 5 10 15  
 Xaa Ala Val Arg Arg Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn Gly Xaa Xaa Tyr  
 20 25 30  
 Xaa Gln Xaa Val Xaa Asn Xaa  
 35 39

【0120】配列番号：3

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

配列

Asn Gly Lys Lys Tyr Lys Gln Lys Val Lys Asn Lys  
 1 5 10 12

【0121】配列番号：4

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

配列

Gly Arg Arg Tyr Arg Gln Arg Val Arg Asn Arg

24

\*流改善剤を提供することができる。また、本発明のペプチドは育毛効果および性行動の活性化効果を有するため、育毛剤およびインポテンツ治療剤として有用である。

【0118】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：38

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

他の情報：29位のXaa、30位のXaa、32位のXaa、34位のXaa、36位のXaaおよび38位のXaaは、同一でも異なってもよく、それぞれLysまたはArgを示し；17位のXaaは、Met、LeuおよびnLeuからなる群から選ばれるアミノ酸を示す。ただし、29位のXaa、32位のXaa、および38位のXaaが同時にLysであり、かつ30位のXaaおよび36位のXaaが同時にArgになることはない。

※他の情報：30位のXaa、31位のXaa、33位のXaa、35位のXaa、37位のXaaおよび39位のXaaは、同一でも異なってもよく、それぞれLysまたはArgを示し；17位のXaa、Met、LeuおよびnLeuからなる群から選ばれるアミノ酸を示す。

※

40 ★トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

★

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

25

2

1

10 11

【0122】配列番号：5

\*トポロジー：直鎖状

配列の長さ：8

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

\*

配列

Asn Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1

5

8

【0123】配列番号：6

※トポロジー：直鎖状

配列の長さ：7

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

※10

配列

Gly Lys Arg Lys Arg Arg Lys

1

5

7

【0124】配列番号：7

★トポロジー：直鎖状

配列の長さ：38

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

★

配列

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Arg Gln

1

5

10

15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys

20

25

30

Gln Arg Val Lys Asn Lys

35

38

【0125】配列番号：8

☆トポロジー：直鎖状

配列の長さ：38

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

☆

配列

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Arg Gln

1

5

10

15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Arg Arg Tyr Arg

20

25

30

Gln Arg Val Arg Asn Arg

35

38

【0126】配列番号：9

◆トポロジー：直鎖状

配列の長さ：39

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

◆

配列

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln

1

5

10

15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn Gly Lys Arg Tyr

20

25

30

Lys Gln Arg Val Lys Asn Lys

35

39

【0127】配列番号：10

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：39

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

配列

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln

1

5

10

15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn Gly Arg Arg Tyr



27  
Arg Gln Arg Val Arg Asn Arg  
35 39

25

30

28

【図面の簡単な説明】

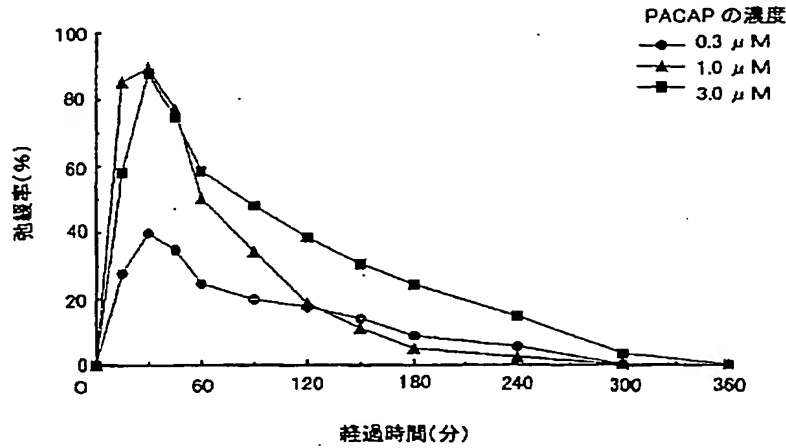
【図1】 PACAPを添加した場合の気管支平滑筋の弛緩率の経時変化を示す図である。

【図2】 実施例1で得られたペプチド1を添加した場合の気管支平滑筋の弛緩率の経時変化を示す図である。

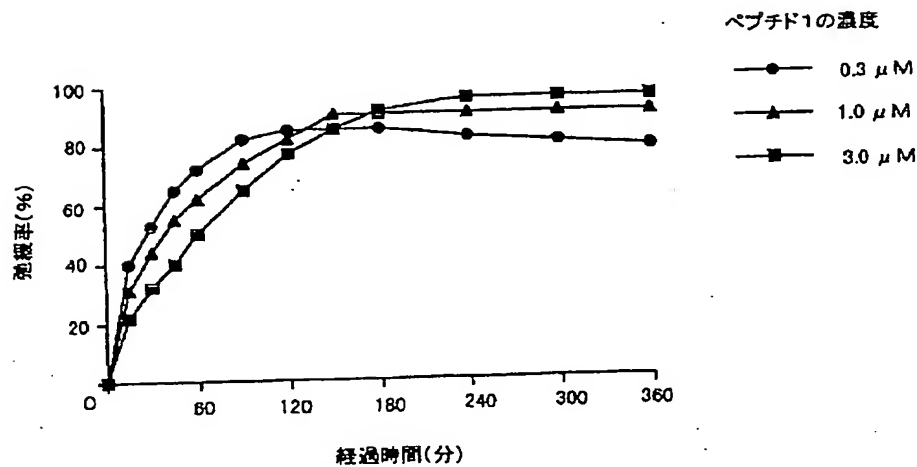
【図3】 VIPを添加した場合の気管支平滑筋の弛緩率の経時変化を示す図である。

【図4】 実施例3で得られたペプチド3を添加した場合の気管支平滑筋の弛緩率の経時変化を示す図である。

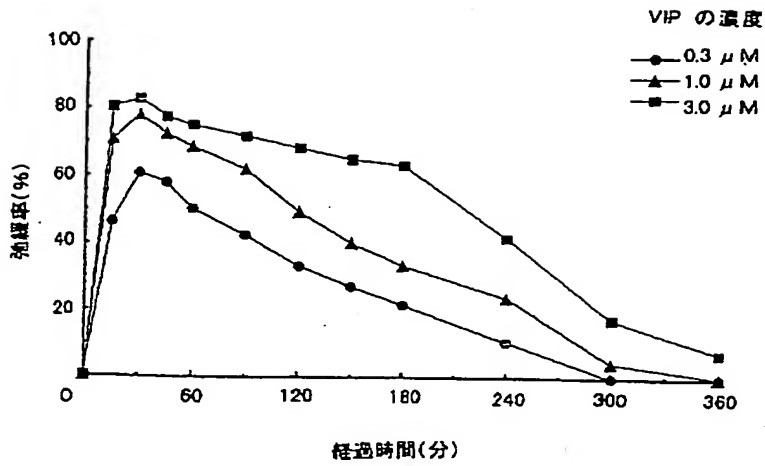
【図1】



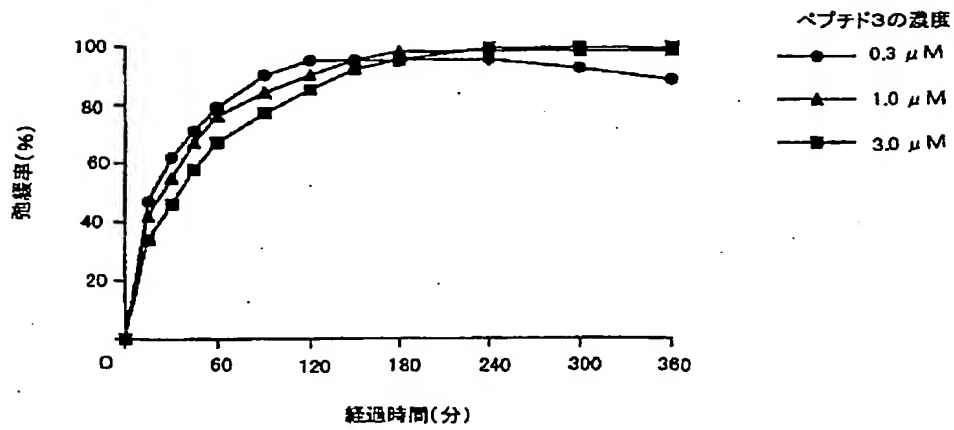
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

A 61 K 38/00

C 12 N 15/09

識別記号

ADT

F I

A 61 K 37/02

C 12 N 15/00

ADT

A